



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

# **ISOLASI DAN KARAKTERISASI KUMARIN DARI KULIT JERUK BALI (*Citrus maxima* (Burm. Fz) Merr)**

## **SKRIPSI**



**LOKITA AKNESIA  
06132015**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG 2011**

## ABSTRAK

### ISOLASI DAN KARAKTERISASI KUMARIN DARI KULIT BUAH JERUK BALI

*(Citrus Maxima (Burm.Fz) Merr)*

Oleh :

Lokita Aknesia (06132015)

Dibimbing oleh Prof. Dr. Sanusi Ibrahim dan Bustanul Arifin, M.Si

Isolasi senyawa kumarin dari kulit buah jeruk bali (*Citrus maxima (Burm.Fz) Merr*) telah dilakukan dengan metoda maserasi menggunakan pelarut metanol dan fraksinasi dengan menggunakan n-heksana dan etil asetat. Fraksi n-heksana dikromatografi menggunakan silika gel sebagai fasa diam dan n-heksana : etil asetat sebagai eluen dengan berbagai perbandingan pelarut. Senyawa hasil isolasi berupa kristal berwarna putih yang memberikan noda tunggal setelah di-KLT pada berbagai komposisi eluen. Data UV memberikan serapan maksimal pada panjang gelombang 322 nm dan 241 nm. Spektrum IR memberikan serapan pada angka gelombang :  $3443\text{ cm}^{-1}$ ,  $2931\text{ cm}^{-1}$ ,  $2859\text{ cm}^{-1}$ ,  $1730\text{ cm}^{-1}$ ,  $1459\text{ cm}^{-1}$ ,  $1375\text{ cm}^{-1}$  dan  $1183\text{ cm}^{-1}$ . Dari hasil analisis spektrum UV dan spektrum IR, senyawa hasil isolasi adalah senyawa golongan kumarin.

## ABSTRACT

### Isolation and Characterization Of Coumarin from Peel of Jeruk Bali

(*Citrus maxima* (Burm. Fz) Merr)

By

Lokita Aknesia (06 132 015)

Bachelor of Sciences Chemistry

Faculty of Mathematic and Natural Science Andalas University

Advised by Prof. Dr. Sanusi Ibrahim And Bustanul Arifin, M.Si

Isolation of coumarin compound from peel of jeruk bali (*Citrus maxima* (Burm. Fz) Merr) has been done with maseration method using methanol and fractionation using n-hexana and ethyl acetate. N-hexana fraction was column by chromatographed using silica gel as state phase and n-hexana : ethyl acetate as mobile phase by using isochratic method. The isolated compound obtain white crystal which gives single spot in various eluent. From UV spectroscopy data gives the maximum absorbance at wavelength 322 nm and 241 nm. IR spectra gives absorbance wavenumber at : 3443  $\text{cm}^{-1}$ , 2931  $\text{cm}^{-1}$ , 2859  $\text{cm}^{-1}$ , 1730  $\text{cm}^{-1}$ , 1459  $\text{cm}^{-1}$ , 1375  $\text{cm}^{-1}$  dan 1183  $\text{cm}^{-1}$ . According to analysis of UV and IR spectra, pure compound that was isolated is coumarin.



## KATA PENGANTAR



Puji dan syukur penulis ucapkan kehadiran Allah Subhaanahuwata'ala atas nikmat dan karunia-Nya kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan proposal penelitian yang berjudul **"Isolasi Senyawa Kumarin dari Kulit Jeruk Bali (*Citrus maxima* (Burm. Fz) Merr**

Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk mengikuti ujian sarjana yang didapat dari penelitian bidang Kimia Organik Bahan Alam di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas Padang.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Prof.Dr.Sanusi Ibrahim, M.Sc dan Bustanul Arifin, M.Si selaku Pembimbing yang telah memberikan banyak ilmu, nasehat, bimbingan dan arahan selama penulis melakukan penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Bapak Hasnirwan, M.Si, Ibu Dr. Refilda dan Ibu Marniati Salim, M.S yang telah berbagi ilmu kepada penulis.
3. Rekan-rekan se-KOBA dan teman-teman mahasiswa yang telah memberikan dorongan dan semangat kepada penulis.

Menyadari keterbatasan penulis dalam melakukan penelitian ini, penulis berharap kritik dan saran yang membangun agar penelitian ini dapat disumbangkan bagi ilmu pengetahuan.

Padang, Agustus 2011

Penulis



## DAFTAR ISI

<b>ABSTRAK</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ii</b>
<b>KATA PENGANTAR</b>	<b>iii</b>
<b>DAFTAR ISI</b>	<b>iv</b>
<b>DAFTAR TABEL</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	<b>viii</b>
<b>I.PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
<b>II.TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Tinjauan Botani	3
2.2 Kandungan Kimia Dan Kegunaan	4
2.3 Kumarin	5
2.4 Metoda isolasi Kumarin	12
2.5 Karakterisasi Kumarin	13
<b>III.METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	17
3.2 Alat dan Bahan	17
3.3 Persiapan Sampel	18
3.4 Persiapan Pelarut	18
3.5 Uji Profil Fitokimia	18
<b>3.6 Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Kumarin dari Kulit Buah Jeruk Bali</b>	
3.6.1 Ekstraksi	20
3.6.2 Fraksinasi	20

3.6.3 Pemurnian	21
3.6.4 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi	22
<b>IV.HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Hasil	24
4.2 Pembahasan	29
<b>V.KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan	36
5.2 Saran	36
<b>DAFTAR KEPUSTAKAAN</b>	37
<b>LAMPIRAN</b>	39



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 1.</b> Warna fluoresensi kumarin yang tersubstitusi di bawah sinar ultraviolet	11
<b>Tabel 2.</b> Daerah serapan senyawa kumarin dengan spektroskopi UV	14
<b>Tabel 3.</b> Uji pendahuluan profil fitokimia kulit buah jeruk bali	23
<b>Tabel 4.</b> Uji pendahuluan profil fitokimia pada fraksi n-heksana dan etil asetat	24
<b>Tabel 5.</b> Hasil KLT fraksi n-heksana dengan berbagai perbandingan pelarut	26
<b>Tabel 6.</b> Perbandingan pelarut yang digunakan untuk mengelusi	27
<b>Tabel 7.</b> Nilai Rf dari senyawa hasil isolasi dengan berbagai perbandingan pelarut	28
<b>Tabel 8.</b> Spektrum UV dari senyawa hasil isolasi dengan metanol ditambah pereaksi geser	28
<b>Tabel 9.</b> Spektrum IR dari senyawa hasil isolasi	29



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 1.</b> Senyawa alkaloid hasil isolasi dari kulit batang <i>Citrus maxima</i> (Burm. Fz) Merr	4
<b>Gambar 2.</b> Struktur kerangka dasar kumarin	6
<b>Gambar 3.</b> Struktur Umbelliferone dan Scopoletin	7
<b>Gambar 4.</b> Struktur Psoralen dan Angelicin	7
<b>Gambar 5.</b> Struktur Piranokumarin	7
<b>Gambar 6.</b> Struktur 3-fenilkumarin	8
<b>Gambar 7.</b> Hidrolisis lakton menjadi garam kumarinat	8
<b>Gambar 8.</b> Mekanisme reaksi kondensasi <i>Pechmann</i>	9
<b>Gambar 9.</b> Reaksi antara Resorcinol dengan EtilAsetoasetat	9
<b>Gambar 10.</b> Sintesis Umbelliferone melalui mekanisme reaksi <i>Pechmann</i>	10
<b>Gambar 11.</b> Spektrum UV senyawa hasil isolasi dengan pelarut MeOH	30
<b>Gambar 12.</b> Spektrum UV senyawa hasil isolasi dengan pereaksi geser NaOMe	31
<b>Gambar 13.</b> Spektrum UV senyawa hasil isolasi dengan pereaksi geser NaOAc dan NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	32
<b>Gambar 14.</b> Spektrum UV senyawa hasil isolasi dengan pereaksi geser AlCl <sub>3</sub> Dan AlCl <sub>3</sub> + HCl	32
<b>Gambar 15.</b> Spektrum IR senyawa hasil isolasi	33

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema Kerja isolasi kumarin dari kulit buah jeruk bali ( <i>Citrus maxima</i> (Burm. Fz) Merr	39
Lampiran 2.	Skema kerja Pemisahan fraksi (+) Kumarin ekstrak n-heksana kulit buah jeruk bali	40
Lampiran 3.	Gambar Hasil KLT senyawa isolasi dengan berbagai perbandingan eluen.	41
Lampiran 4.	Spektrum UV golongan kumarin standar	42
Lampiran 5.	Gambar Tumbuhan Jeruk Bali ( <i>Citrus maxima</i> (Burm.Fz) Merr).	43



# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Indonesia memiliki kekayaan alam yang melimpah pada sumber daya alam hayati. Kekayaan ini telah dimanfaatkan oleh masyarakat untuk berbagai keperluan, antara lain sebagai bahan baku industri, pangan dan sebagai obat. Banyak jenis tumbuhan yang sudah dimanfaatkan sejak lama sebagai obat-obatan tradisional tapi belum diketahui senyawa kimia yang terkandung di dalamnya.<sup>1</sup>

Kandungan kimia tersebut sering memberikan efek fisiologi dan farmakologi sehingga lebih dikenal dengan senyawa aktif. Senyawa aktif ini merupakan hasil metabolisme sekunder dari tumbuhan itu sendiri dimana penyebaran dan jumlahnya dalam tiap bagian tumbuhan tidak sama. Hal ini mendorong para ahli untuk melakukan penelitian tentang isolasi, sintesis, uji bioaktivitas dan pemanfaatannya lebih lanjut.<sup>2</sup>

Puluhan varietas jeruk ada di muka bumi dari yang bercitarasa asam hingga manis. Walaupun berbeda warna, bentuk dan rasa, jeruk memiliki keasaman, yaitu kaya akan antioksidan, tinggi mineral dan vitamin C. Daging buahnya yang segar dan banyak mengandung air, bisa langsung dimakan setelah dikupas atau sebagai campuran salad maupun rujak. Buahnya yang berwarna putih dapat dijadikan manisan setelah dibuang bagian kulit luarnya yang banyak mengandung kelenjar minyak. Di Vietnam, bunganya yang harum digunakan untuk membuat parfum.

Jeruk bali mengandung vitamin B, provitamin A, vitamin B1, B2 dan asam folat. Kandungan lain seperti flavonoid, pektin dan likopen menjadikan buah ini semakin kaya akan zat-zat yang bermanfaat bagi kesehatan.<sup>4</sup>

Berdasarkan hal ini, maka penelitian ini ditekankan untuk mengisolasi salah satu dari senyawa metabolit sekunder tersebut yaitu kumarin. Penelitian ini dilakukan dengan metoda ekstraksi secara maserasi dengan menggunakan pelarut metanol, fraksinasi dengan n-heksan dan etil asetat, pemisahan dan pemurnian komponen



kimia dengan kromatografi, serta karakteristisasi senyawa dengan melakukan pemeriksaan secara konvensional dan spektrofotometri.

## 1.2 Perumusan Masalah

Adapun rumusan masalah yang ada pada penelitian ini :

1. Metabolit sekunder apa saja yang terdapat pada tanaman jeruk bali (*Citrus maxima* (Burm.Fz) Merr)?
2. Apakah terdapat senyawa kumarin dari kulit buah jeruk bali (*Citrus maxima* (Burm.Fz) Merr)?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi konstituen kumarin dari bagian kulit tanaman jeruk bali (*Citrus maxima* (Burm.Fz) Merr).

## 1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menginformasikan senyawa kumarin yang terdapat pada ekstrak kulit tanaman jeruk bali (*Citrus maxima* (Burm.Fz) Merr) sehingga mampu memberikan kontribusi positif dalam pengembangan Kimia Organik Bahan Alam, serta berguna dalam pengembangan industri obat-obatan.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan Botani

##### 2.1.1 Tanaman Jeruk Bali (*Citrus maxima* (Burm. Fz) Merr)

*Citrus maxima* (Burm. Fz) Merr adalah tumbuhan menahun (perennial) dengan karakteristik tinggi pohon 5-15 meter. Batang tanaman agak kuat, garis tengah 10-30 sentimeter, berkulit agak tebal, kulit bagian luar berwarna coklat kekuningan, bagian dalam berwarna kuning. Pohon jeruk mempunyai banyak cabang yang terletak saling berjauhan dan merunduk pada bagian ujungnya. Cabang yang masih muda bersudut dan berwarna hijau, namun lama-lama menjadi berbentuk bulat dan berwarna hijau tua. Tajuk pohon agak rendah dan tidak teratur.

Tanaman jeruk bali dalam sistematika tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta ( berbiji )
Sub-Divisio	: Angiospermae ( berbiji tertutup)
Kelas	: Dicotylendoneae ( berkeping dua )
Ordo	: Rutales
Familia	: Rutaceae
Genus	: Citrus
Species	: <i>Citrus maxima</i> (Burm. Fz) Merr

##### 2.1.2 Morfologi Tanaman

*Citrus maxima* tumbuhan menahun (perennial) dengan karakteristik tinggi pohon 5-15 meter. Batang tanaman agak kuat, garis tengah 10-30 sentimeter, berkulit agak tebal, kulit bagian luar berwarna coklat kekuningan, bagian dalam berwarna kuning. Pohon jeruk mempunyai banyak cabang yang terletak saling berjauhan dan merunduk pada bagian ujungnya. Cabang yang masih muda bersudut dan berwarna hijau, namun lama-lama menjadi berbentuk bulat dan berwarna hijau tua. Tajuk pohon agak rendah dan tidak teratur.

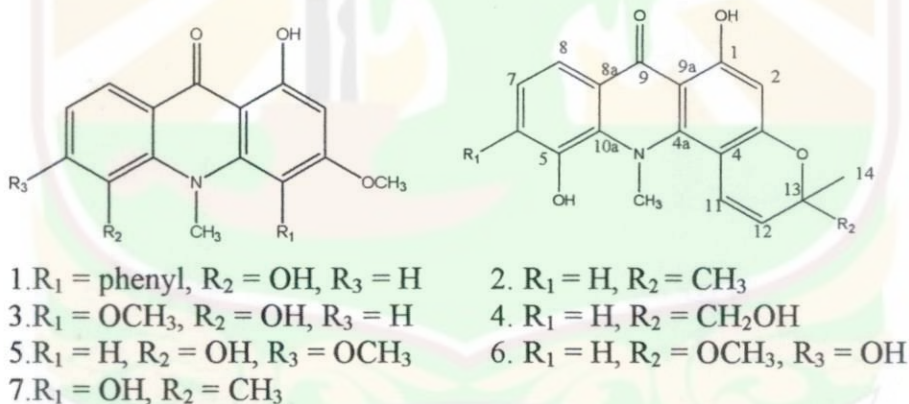
Daun tanaman berbentuk bulat telur dan berukuran besar, dengan bagian puncak atau ujung tumpul dan bagian tepi hampir rata, serta bagian dekat ujung agak berombak. Letak daun terpencair dengan tangkai daun bersayap lebar, warna kekuningan, dan berbulu agak suram.

## 2.2 Kandungan Kimia Dan Kegunaan Tumbuhan Jeruk Bali (*Citrus maxima* (Burm. Fz) Merr

### 2.2.1 Kandungan Kimia

Berdasarkan studi literatur kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuhan jeruk bali (*Citrus maxima* (Burm. Fz) Merr yaitu flavonoid, steroid, fenolik dan minyak atsiri.

Isolasi senyawa metabolit sekunder dilakukan terhadap kulit kayu (korteks) *Citrus maxima* (Burm. Fz) Merr telah ditemukan 7 senyawa alkaloid dari kelompok acridone: 5-hydroxynoracronycine alcohol (4), glycoctrine-I (1), 5-OH-noracronycine (2), citrussinine-I (3), grandisine-I (5), natsucitrine-II (6), dan citracridone-III (7) (Teng et al., 2005).



**Gambar 1.** Senyawa alkaloid hasil isolasi dari kulit batang *Citrus maxima* (Burm.Fz) Merr.

Jeruk bali mengandung vitamin B, provitamin A, vitamin B1, B2 dan asam folat. Setiap 100 gram jeruk bali mengandung 53 kkal energi, protein 0,6 gram, lemak



0.2 gram, karbohidrat 12.2 gram, retinol 125 miligram, kalsium 23 miligram dan 27 miligram fosfor<sup>4</sup>.

### **2.2.2 Kegunaan Tanaman Jeruk Bali (*Citrus maxima* (Burm. Fz) Merr**

Penggunaan buah dan daun jeruk bali telah dikenal oleh masyarakat sejak dahulu sebagai obat tradisional. Senyawa terkandung di dalam jeruk bali mampu mencegah kanker, menurunkan risiko penyakit jantung, melancarkan saluran pencernaan, menjaga kesehatan kulit, mencegah konstipasi, menurunkan kolesterol dan mencegah anemia. Kandungan likopen pada jeruk bali cukup tinggi, yaitu 350 mikrogram per 100 gram daging buah. Jika bersinergi dengan betakaroten (provitamin A) yang banyak terdapat pada jeruk bali, likopen bisa berperan sebagai antioksidan. Jeruk bali dipercaya mengandung zat aktif yang dapat membersihkan sel darah merah yang telah tua di dalam tubuh dan menormalkan hematokrit, yaitu persentase sel darah per volume darah. Tingkat hematokrit normal pada wanita adalah 37-47 persen, sedangkan laki-laki 40-54 persen. Rendahnya hematokrit akan menyebabkan anemia, tetapi jika sangat tinggi dapat memicu penyakit jantung karena darah jadi mengental. Hasil penelitian, jeruk bali termasuk antikanker yang sekaligus menyehatkan prostat.<sup>4</sup>

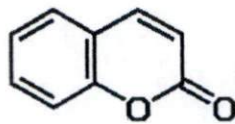
## **2.3. Kumarin**

### **2.3.1 Sejarah Perkembangan Kumarin**

Isolasi kumarin pertama kali dilaporkan oleh Vogel di Munich (1820). Vogel mengisolasi senyawa tersebut dari tumbuhan *Melilotus officinalis*, yang memiliki aroma khas seperti tumpukan jerami kering. Nama kumarin berasal dari bahasa Karibia "Coumarou" yang artinya pohon tonka dengan nama latin *Coumarona odorata*. Pada tahun 1968 diketahui bahwa kumarin memiliki rumus molekul  $C_9H_6O_2$ .<sup>5</sup>

Sintesis kumarin pertama kali dilakukan oleh W.H. Perkin Snr, beliau memperlakukan garam Natrium dari orto-hidroksi-benzaldehid dengan anhidrida asetat, senyawa yang didapat sama dengan hasil isolasi dari kacang tonka. Struktur

yang disarankan oleh Bäsecke (1970). Struktur kumarin yang diterima sampai sekarang adalah struktur yang diajukan oleh Fitting dan Strecker (1968) dan Tieman-Herzfeld (1977).<sup>6</sup>



**Gambar 2.** Struktur Kumarin yang disarankan Fitting dan Strecker (1968) Dan Tieman – Herzfeld (1977)

### 2.3.2 Penyebaran dan Kegunaan Kumarin

Kumarin banyak terdapat pada tumbuhan *Angiospermae* dan tidak jarang pada *Gymnospermae* serta tumbuhan tingkat rendah. Pada umumnya terdapat pada famili *Rutaceae*, *Leguminosae*, *Umbelliferae* dan *Graminae*. Kumarin ditemukan hampir di setiap bagian tumbuh-tumbuhan mulai dari akar, batang, daun sampai bunga dan juga buah (Robinson, 1995).

Senyawa kumarin dan turunannya banyak memiliki aktifitas biologis diantaranya sebagai anti koagulan darah, antibiotik dan ada juga yang menunjukkan aktifitas menghambat efek karsinogenik. Selain itu kumarin juga digunakan sebagai bahan dasar pembuatan parfum dan sebagai bahan fluoresensi pada industri tekstil dan kertas (Murray, 1982).

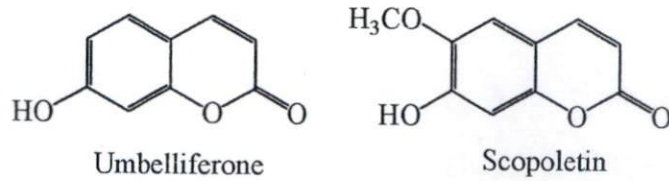
### 2.3.3 Klasifikasi Kumarin

Kumarin memiliki inti 1-benzopiran-2-one yang tersebar luas pada tumbuhan tingkat tinggi maupun tingkat rendah. Kumarin biasanya terdapat dalam bentuk kompleks dengan gula (glikosida) atau senyawa lainnya. Senyawa glikosida yang dihasilkan dapat dipisahkan dengan asam, aksi enzimatis atau radiasi ultraviolet<sup>[7]</sup>.

Secara umum struktur senyawa-senyawa kumarin diklasifikasikan atas empat kategori, yaitu :

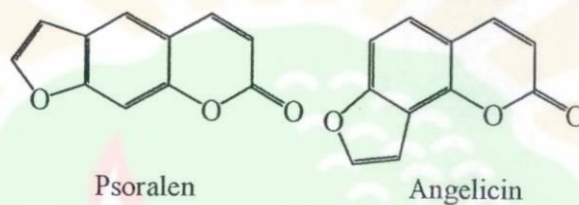


1. Kumarin sederhana, yaitu kumarin dan turunannya berupa alkoksilasi, hidroksilasi, alkilasi, atau glikosida. Contohnya :



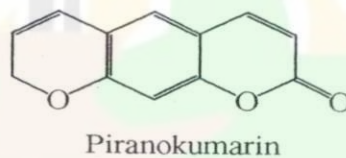
**Gambar 3.** Struktur Umbelliferone dan Scopoletin

2. Furanokumarin, terdiri dari jenis linier (psoralen) dan angular (angelicin) dengan substituen pada posisi benzoid yang tidak terpakai. Contohnya :



**Gambar 4.** Struktur Psoralen dan Angelicin

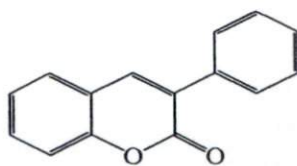
3. Piranokumarin, analog dengan furanokumarin yang memiliki cincin hetero lingkar enam. Contoh :



**Gambar 5.** Struktur Piranokumarin



4. Kumarin tersubstitusi pada cincin piron. Contohnya :



3-fenilkumarin

**Gambar 6.** Struktur 3-fenilkumarin

#### 2.3.4 Sifat-sifat Kumarin

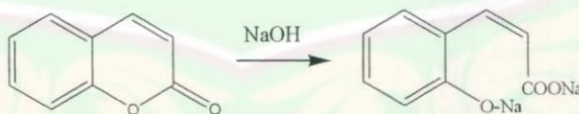
Kumarin dapat dikenal dari baunya. Bila daun yang mengandung kumarin dikeringkan, maka akan menimbulkan bau yang khas dari kumarin. Untuk pembuktian secara kualitatif dilakukan uji berdasarkan sifat fluoresensinya.

Senyawa kumarin sederhana seperti umbelliferone memiliki sifat fisika sebagai berikut :

- Kristalnya tidak berwarna, berbentuk ortorombik atau rektangular
- Titik leleh 68-70°C
- Titik didih 297-299°C
- Mulai menyublim pada suhu 100°C
- Larut 0,25g/100 ml air pada suhu 25°C

Seterusnya sifat-sifat kimia dari senyawa kumarin sederhana adalah :

- Lakton mudah terhidrolisis oleh alkali menjadi garam kumarinat,

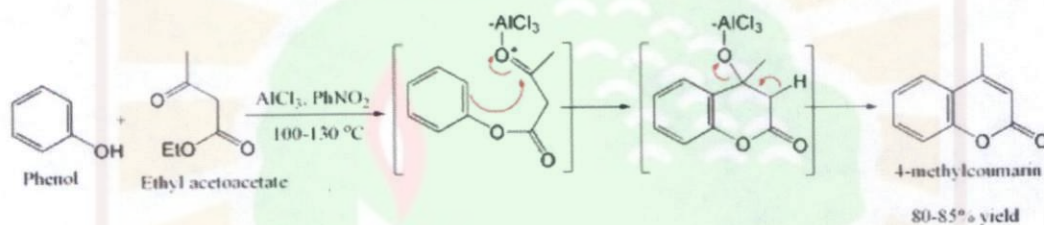


**Gambar 7.** Hidrolisis lakton menjadi garam kumarinat

- Mudah larut dalam kloroform, eter, minyak dan larutan alkali.
- Cahaya matahari atau radiasi dalam waktu lama mengubah kumarin dalam bentuk dimer.

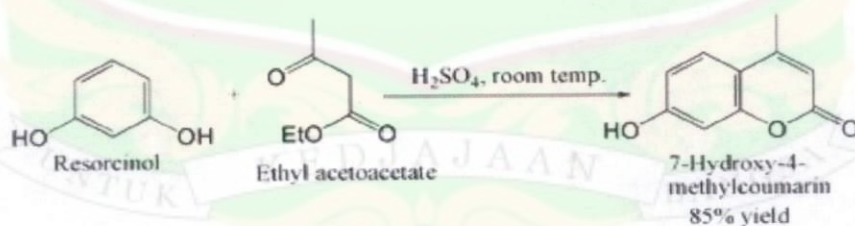
### 2.3.5. Biosintesis Kumarin

Kondensasi Pechmann adalah sintesis dari kumarin, mulai dari fenol dan asam karboksilat atau ester yang mengandung kelompok  $\beta$ -karbonil. kondensasi ini dilakukan di bawah kondisi asam. Mekanisme ini melibatkan sebuah esterifikasi / transesterifikasi diikuti dengan serangan dari orto karbonil diaktifkan untuk oksigen untuk menghasilkan cincin baru. Langkah terakhir adalah dehidrasi, seperti terlihat berikut kondensasi aldol. Hal ini ditemukan oleh kimiawan Jerman Hans von Pechmann<sup>8</sup>.



**Gambar 8.** Mekanisme reaksi kondensasi *Pechmann*

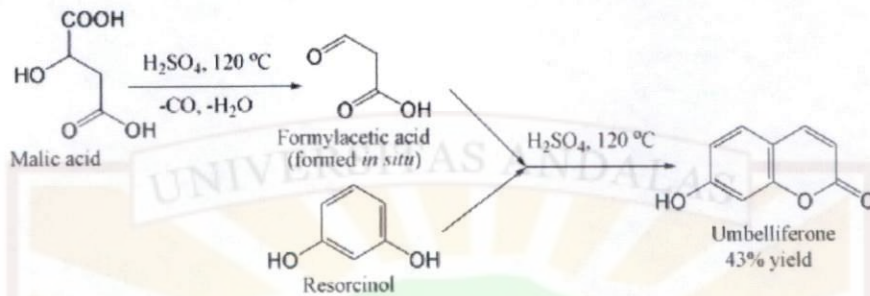
Dengan fenol yang sangat aktif seperti resorsinol, reaksi dapat dilakukan dalam kondisi yang jauh lebih ringan. Ini memberikan rute yang berguna untuk turunan umbelliferone<sup>11</sup>.



**Gambar 9.** Reaksi antara Resorcinol dengan Etil Asetoasetat

Untuk kumarin yang tak tersubstitusi di posisi 4, metode ini membutuhkan penggunaan asam formylacetic atau ester. Ini tidak stabil dan tidak tersedia secara

komersial, tetapi asam dapat dihasilkan in situ dari asam malat dan asam sulfat di atas 100 °C. Begitu bentuk, asam formylacetic melakukan kondensasi Pechmann. Pada contoh yang ditunjukkan, umbelliferone sendiri diproduksi, meskipun dalam hasil rendah<sup>11</sup>:



**Gambar 10.** Sintesis Umbelliferone melalui mekanisme reaksi *Pechmann*

### 2.3.6 Identifikasi Kumin

Adanya golongan kumin yang tidak bisa diidentifikasi dengan pereaksi kimia tetapi bisa diidentifikasi dari warna fluoresensinya saja. Maka warna fluoresensi dari senyawa kumin yang diungkapkan dengan sinar ultraviolet (365 nm) memberikan hasil sesuai data pada Tabel 1 sebagai berikut<sup>5</sup>



**Tabel 1.** Warna fluorisensi kumarin yang tersubstitusi di bawah sinar ultraviolet

Warna Flourisensi		Kumarin atau tipe kumarin
Tanpa Amonia	Dengan Amonia	
Biru	Biru Terang	7-hidroksikumarin
Biru	Biru berkilap	Turunan 7-hidroksi-6-alkoksikumarin
		6-metiksiangelicin
Biru	Biru	Turunan 5,7-dialkoksi-kumarin
		Turunan 6,7,8-trialkoksikumarin psoralen
Biru	Hijau	7,8-dihidroksikumarin
Biru	Kuning	Luvangetin
Biru berkilap	Biru sangat berkilap	Turunan 7-hidroksikumarin
	Biru berkilap	Turunan 6,7-dialkoksikumarin
Biru lemah	Biru lemah	Turunan 5,6,7-trialkoksikumarin
	Biru berkilap	Turunan 7-hidroksi-5,6-dialkoksikumarin
Merah muda	Kuning	6-hidroksi-7-glukosiloksi kumarin
Ungu	Ungu	Turunan 7-alkoksi kumarin,dihidrofuran
		Dan dihidropiran
		Turunan 8-hidroksi-5-alkoksipsoralen
Ungu lemah	Hijau	Angelicin, kumestrol
		Turunan 6-hidroksi-7-alkoksikumarin
Hijau		5-metoksiangelicin
		8-hidroksi-6,7-dimetoksikumarin
		7,8-dihidroksi-6-metoksikumarin
Hijau-kuning	Hijau-kuning	Turunan 5-alkoksi-psoralen
Kuning		7-hidroksi-8-metoksikumarin
		Eksostemin
		3,4,5-trimetoksipsoralen
		6-hidroksi-5,6-dimetoksikumarin
		5-hidroksi-6,7-dimetoksikumarin
		5-hidroksipsoralen
		5,6-dimetoksiangelicin
		Turunan 8-alkoksipsoralen
Kuning berkilap	Kuning berkilap	Turunan 5,8-dialkoksipsoralen

## **2.4. Metoda Isolasi Kumarin**

### **2.4.1. Ekstraksi Kumarin**

Senyawa kimia dari bahan alam dapat diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut organik. Pengekstraksian dapat dilakukan dengan berbagai cara. Cara yang dipilih harus dipertimbangkan, sehingga komponen kimia yang diinginkan tidak mengalami perubahan struktur. Metoda ekstraksi yang digunakan antara lain maserasi, perkolasi dan sokletasi.

Secara umum prosedur isolasi tergantung pada ekstraksi berulang dari sampel kering atau basah dengan pelarut yang ditingkatkan kepolarannya, yaitu petroleum eter, benzena, eter, aseton dan metanol merupakan pelarut yang baik digunakan.

Pemisahan kumarin dari klorofil daun, lilin dan konstituen lainnya merupakan masalah lain yang harus ditangani. Steek dan Bailey telah memecahkan masalah tersebut dengan melakukan homogenisasi dengan metanol 60 % terlebih dahulu. Filtrat metanol 60 % dicuci dengan heksana untuk menghilangkan klorofil dan komponen lemak lainnya. Heksana tersebut diekstraksi kembali dengan satu kali dengan metanol 60 % yang kemudian digabungkan dengan yang pertama. Pemekatan larutan memberikan suspensi yang kemudian diekstrak dengan eter untuk mengambil kumarin.

Pendekatan yang sama telah dilakukan oleh peneliti lain untuk menghilangkan lemak dari ekstrak eter. Setelah penguapan dengan hati – hati, residu gum dilarutkan dalam metanol 90 % dan dihilangkan lemaknya dengan petroleum eter atau dipartisi dengan asetonitril dan heksan (1:1), dan fasa hidrokarbonnya dibuang<sup>5</sup>.

### **2.4.2. Fraksinasi Kumarin**

Umumnya sebelum dilakukan identifikasi kumarin untuk mendapatkan strukturnya, dilakukan pemisahan dan pemurnian dari ekstrak kasar. Sejak diketahui banyak tumbuh-tumbuhan mempunyai campuran yang kompleks, pemisahan ini menjadi lebih sulit. Beberapa metode kromatografi akhirnya mempermudah pemisahan campuran kumarin.



Metoda kromatografi yang tertua yang masih digunakan sampai saat sekarang adalah kromatografi kolom. Kromatografi kolom pada silika gel dan asam silikat telah banyak dilakukan untuk pemisahan campuran. Hasil yang baik telah diperoleh dengan menggunakan kombinasi berbagai pelarut mulai dari pelarut non polar sampai pelarut polar.

Fraksi yang dikumpulkan dari kolom dimonitor dengan menggunakan Kromatografi Lapisan Tipis (KLT), dan diungkapkan dengan memeriksa plat KLT di bawah sinar UV atau uap iodium.

## **2.5. Karakterisasi Kumarin**

### **2.5.1. Metoda Identifikasi Kromatografik**

Metoda identifikasi kromatografik yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi kumarin dan turunannya adalah fluoresensi, reaksi kromogenik dan Kromatografi lapisan tipis.

Pada umumnya senyawa turunan kumarin memberikan fluoresensi yang intensif setelah kromatogram disemprot dengan ammonia yang dapat menunjukkan kelompok fenolik dari kumarin. Warna yang diberikan oleh kumarin akan intensif bila disemprot dengan KOH 10% dalam metanol atau  $\text{SbCl}_3$  20% dalam kloroform.

Kromatografi lapisan tipis dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa kumarin yang belum diketahui, dengan cara membandingkannya dengan senyawa kumarin yang sudah diketahui berdasarkan harga  $R_f$ -nya.  $R_f$  (*Retention Faktor*) merupakan perbandingan jarak yang ditempuh oleh komponen dengan jarak yang ditempuh oleh eluen.

Sistem eluen yang digunakan dapat bervariasi dapat berupa satu jenis pelarut atau campuran dari beberapa jenis pelarut dengan kombinasi tertentu.



### 2.5.2. Spektroskopi Ultraviolet

Pemakaian spektroskopi UV dalam penentuan struktur molekul senyawa organik prinsipnya berdasarkan kepada transisi elektron dari orbital yang memiliki tingkat energi yang lebih rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi. Elektron-elektron dalam molekul pada keadaan biasa berada pada tingkat energi dasar. Adanya energi yang berasal dari energi elektromagnetik dapat berinteraksi dengan molekul organik, akibatnya elektron yang berada pada keadaan dasar dapat berpindah ke orbital yang lebih tinggi elektronnya (tereksitasi). Bagian molekul yang mampu menyerap energi untuk melakukan proses eksitasi disebut kromofor.<sup>8,9</sup>

Pada sistem yang terkonjugasi orbital  $\pi$  dan masing-masing ikatan rangkap berinteraksi membentuk suatu perangkat baru orbital ikatan dan anti ikatan. Bila sistem terkonjugasi ini bertambah panjang, energi yang diberikan untuk transisi  $\pi-\pi^*$  makin kecil, absorpsi akan terjadi pada panjang gelombang yang lebih panjang. Kenyataan juga menunjukkan bahwa dalam larutan polar akan memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang yang lebih panjang dari dalam pelarut non polar (efek batokromik).

Senyawa kumarin dengan spektroskopi UV dapat memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 274 nm dan 311 nm. Serapan ini menunjukkan adanya cincin benzen dan cincin piron. Untuk senyawa turunan kumarin akan memberikan serapan pada daerah-daerah tertentu seperti yang dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Daerah serapan senyawa kumarin dengan spektroskopi UV<sup>5</sup>

No.	Jenis Kumarin	Daerah serapan (nm)
1.	Kumarin yang mengikat alkil	~ 274 dan ~311
2.	Kumarin teroksigenasi	216-226 ; 243-251 ; 255-261 ; 322-335
3.	Kumarin furanokumarin	205-225 ; 240-255 ; 260-270 ; 298-316
4.	Angular furanokumarin	242-245 ; 260-270

Pada pengukuran spektrometer UV diperlukan beberapa pereaksi geser, yaitu NaOMe, NaOAc, NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub> dan AlCl<sub>3</sub>/HCl. Spektrum yang dihasilkan

oleh pereaksi geser NaOMe digunakan untuk mendeteksi adanya gugus hidroksil yang lebih asam dan tidak tersubstitusi. Pereaksi NaOAc hanya menyebabkan pergeseran yang berarti pada gugus OH yang paling asam. Pereaksi geser NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> menjembatani kedua gugus hidroksil pada gugus orto dihidroksi. Pereaksi geser AlCl<sub>3</sub>/HCl dapat membentuk kompleks tahan asam antara gugus OH dan keton yang bertetangga dan membentuk kompleks tak tahan asam dengan gugus orto dihidroksi. Pereaksi ini dapat mendeteksi kedua gugus tersebut.

### 2.5.3 Spektroskopi Inframerah

Untuk mengetahui gugus fungsi yang ada dalam senyawa organik dapat diidentifikasi dengan menggunakan spektroskopi IR. Tidak seperti spektroskopi UV, pada spektroskopi IR, energi yang diberikan oleh sinar infra merah tidak cukup untuk mengeksitasi elektron dari suatu orbital ke orbital lain. Bila sinar infra merah melewati suatu cuplikan senyawa organik, maka sejumlah frekuensi akan diserap, sedangkan sisanya akan diteruskan. Sesuai dengan besar energi inframerah, ia hanya mampu mengadakan perubahan vibrasi dalam molekul.<sup>8,9</sup>

Karena terjadi transisi vibrasi pada hampir seluruh senyawa organik yang menghasilkan spektrum absorpsi yang kompleks dan karakteristik, maka tidak akan ada dua senyawa organik yang mempunyai spektrum IR yang sama, kecuali dua senyawa itu isomer optik. Berdasarkan sifat inilah penggunaan spektroskopi IR merupakan cara yang paling sederhana untuk mengidentifikasi senyawa organik.

Sebagian gugus fungsi yang diidentifikasi tidak berhubungan dengan cincin kumarin, spektroskopi IR digunakan dalam menampakkan fungsi laktone terkonjugasi. Kumarin berisomer dengan kromon, tetapi keduanya mempunyai spektrum IR yang berbeda. Frekuensi rentang karbonil dalam kumarin ( $\alpha$ -piron) ditemukan pada daerah 1700 – 1750 cm<sup>-1</sup> sedangkan kromon ( $\alpha$ -piron) ditemukan pada daerah sekitar 1650 cm<sup>-1</sup>. Beberapa daerah serapan spesifik untuk senyawa kumarin adalah sebagai berikut<sup>5</sup> :



a. Vibrasi regangan C-H aromatik

Dua atau tiga dengan intensitas lemah sampai medium teramati pada daerah 3025-3175  $\text{cm}^{-1}$  dalam spektrum furanokumarin. Penyerapan ini disebabkan adanya vibrasi regangan selain  $\alpha$ -piron, benzene dan cincin furan.

b. Vibrasi regangan C=O

Rentang karbonil  $\alpha$ -piron dari kumarin biasanya ditemukan pada daerah 1700-1750  $\text{cm}^{-1}$ . Harga yang pasti bergantung pada kondisi yang digunakan, frekuensi yang lebih tinggi 1742-1748  $\text{cm}^{-1}$  dalam karbon tetraklorida.

c. Vibrasi regangan C=C

Umumnya terdapat tiga puncak serapan kuat dalam daerah 1600-1660  $\text{cm}^{-1}$  untuk spektra inframerah kumarin. Pola ini dengan mudah dapat dibedakan dari kromon yang biasanya penyerapannya lebih sederhana.





### **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1. Waktu dan Tempat**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang pada bulan Desember 2010 sampai dengan bulan Mei 2011.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat alat destilasi, *rotary evaporator* Heidolph WB 2000, pemanas, plat KLT, pipa kapiler, kertas saring, melting point apparatus, kolom kromatografi (50 cm x 2,5 cm), plat KLT (silika gel 60 F<sub>254</sub>) dan beberapa peralatan gelas yang umum digunakan. Penampak noda menggunakan lampu UV 365 nm. Untuk karakterisasi dengan spektrometer UV-Vis Shimadzu Pharmaspec 1700 dan Spektrometer IR Jascoo 460 Plus

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan adalah metanol teknis yang didistilasi, etil asetat teknis yang didistilasi, n-heksana teknis yang didistilasi, NaOH 1 %, kloroform, FeCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N, amonia, pereaksi Sianidin test (HCl pekat, bubuk Mg), pereaksi Meyer (HgCl<sub>2</sub>, KI), pereaksi Dragendorff {Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O, HNO<sub>3</sub>, KI}, pereaksi Liebermann-Burchard (Anhidrida Asetat/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat), akuades, silika gel 60 Art.7733 keluaran Merck, Aluminium klorida, Natrium Asetat dan Asam Borat.

### 3.3 Persiapan Sampel

Sampel diambil di kelurahan Kampung Baru kecamatan Lubuk Begalung pada bulan Desember 2010 sebanyak 3 kilogram. Bagian yang akan diteliti adalah sampel segar kulit buah jeruk. Dari buah tersebut, diambil kulit buahnya dan didapatkan berat kulit 1,4 kilogram. Sampel kemudian di potong kecil-kecil kemudian ditimbang.

### 3.4 Persiapan Pelarut

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut teknis, seperti metanol, n-heksana, dan etil asetat yang telah didistilasi.

### 3.5 Uji Profil Fitokimia

Metoda pemeriksaan kandungan flavonoid, triterpenoid, steroid dan senyawa fenolik diambil dari Simens et.al.<sup>6</sup>, yaitu :

Sebanyak 2 g sampel kulit buah segar dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dimaserasi dengan metanol yang telah dipanaskan (di atas penangas air) selama 15 menit. Kemudian disaring panas-panas ke dalam tabung reaksi lain dan biarkan seluruh metanol menguap hingga kering. Tambahkan kloroform dan akuades dengan perbandingan 1:1 masing-masing sebanyak 5 mL, kocok dengan baik, kemudian biarkan sejenak hingga terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan kloroform dan lapisan air. Lapisan air pada bagian atas digunakan untuk pemeriksaan senyawa flavonoid, fenolik dan saponin. Sedangkan lapisan kloroform di bagian bawah digunakan untuk pemeriksaan senyawa triterpenoid dan steroid.

#### a. Pemeriksaan Flavonoid (*Sianidin Test*)

Sebanyak 2 mL lapisan air diambil dan dipindahkan dengan menggunakan pipet tetes ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan HCl pekat dan beberapa butir bubuk Mg, terbentuknya warna orange sampai merah menunjukkan adanya flavonoid.



**b. Pemeriksaan Fenolik**

Sebagian dari lapisan air diambil dan dipindahkan dengan menggunakan pipet tetes ke dalam tabung reaksi kecil, kemudian tambahkan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1 % , terbentuknya warna biru sampai ungu menandakan adanya kandungan senyawa fenolik.

**c. Pemeriksaan Saponin**

Dari lapisan air, kocok kuat-kuat dalam sebuah tabung reaksi selama 30 detik, terbentuk busa yang tidak hilang dengan penambahan beberapa tetes  $\text{HCl}$  pekat menunjukkan adanya saponin.

**d. Pemeriksaan Triterpenoid dan Steroid (Liebermann-Burchard)**

Dari lapisan kloroform diambil sedikit dan dimasukkan ke dalam tiga lubang plat tetes, biarkan hingga kering. Ke dalam satu lubang plat tetes ditambahkan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, ke dalam lubang plat tetes lainnya ditambahkan setetes anhidrida asetat dan setetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Terbentuknya warna hijau atau hijau biru menandakan adanya steroid, sedangkan terbentuknya warna merah atau merah ungu menandakan adanya triterpenoid.

Pemeriksaan alkaloid dan kumarin dilakukan dengan menggunakan metoda identifikasi sebagai berikut :

**a. Pemeriksaan Kumarin**

Untuk menguji adanya senyawa kumarin, 2 gram sampel dirajang halus dan diekstrak dengan pelarut metanol. Hasil ekstrak ditotolkan pada garis awal plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler, dibiarkan kering di udara terbuka. Setelah itu dielusi dalam bejana yang berisi 10 mL eluen etil asetat 100%. Noda dimonitor dibawah lampu UV 365 nm.

Hasil KLT dengan eluen yang baik disemprot dengan larutan  $\text{NaOH}$  1% dalam Etanol : air (1:1) dan selanjutnya dilihat dibawah lampu UV 365 nm. Adanya fluoresensi yang bertambah terang setelah disemprot dengan  $\text{NaOH}$  1% menandakan sampel tersebut mengandung senyawa kumarin.



#### **b. Pemeriksaan Alkaloida**

Pemeriksaan alkaloida dilakukan menurut metode Culvenor-Fitzgerald. Kulit buah segar seberat lebih kurang 4 gram dipotong kecil-kecil, digerus dalam lumpang dengan bantuan pasir bersih, dibasahi dengan 10 mL kloroform, kemudian tambahkan 10 mL kloroform amoniak 0,05 M, digerus asam sulfat 2 N, dikocok perlahan dan biarkan sehingga terbentuk pemisahan lapisan asam dan kloroform. Ambil lapisan asam sulfat dan pindahkan ke dalam tabung reaksi lain kemudian tambahkan beberapa tetes pereaksi Meyer. Reaksi positif ditandai dengan kabut putih hingga gumpalan putih/endapan.

### **3.6 Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Kumarin dari**

#### **3.6.1. Ekstraksi**

Maserasi merupakan metoda ekstraksi yang biasa digunakan untuk mengisolasi konstituen kimia tertentu di dalam jaringan tumbuhan dengan menggunakan pelarut. Teknik maserasi dipilih karena sifat senyawa yang belum diketahui dengan jumlah sampel yang cukup banyak. Disamping itu, pengerjaan dengan teknik ini lebih mudah karena didapatkan hari ekstrak yang banyak dan tidak memerlukan energi panas.

Sebanyak 1,4 kg sampel segar kulit buah dimasukkan ke dalam wadah dan dimaserasi dengan menggunakan metanol sebanyak 1,5 liter selama 3 hari. Proses maserasi dilakukan secara berulang hingga pelarut hasil penyaringan tidak lagi berwarna. Hasil maserasi kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*, sehingga didapatkan ekstrak kental sebanyak 361,84 gram.

#### **3.6.2 Fraksinasi**

Ekstrak pekat metanol sebanyak 361,84 gram dilarutkan kembali dengan metanol, lalu difraksinasi dengan pelarut n-heksana (1 : 1) sebanyak 10 kali masing-masing menggunakan 450 mL n-kesana. Dilakukan berulang-ulang hingga dipastikan pelarut n-heksana berwarna sama sebelum dilarutkan dengan ekstrak metanol, atau

tidak ada lagi senyawa yang terlarut dalam pelarut n-heksana. Kemudian fraksi n-heksana diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak pekat n-heksana sebanyak 4,46 gram.

Komponen yang tidak larut dalam pelarut n-heksana (fraksi metanol) kemudian difraksinasi dengan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar dengan penambahan air untuk memperjelas bidang batas.

### 3.6.3 Pemurnian

Sebelum dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom terlebih dahulu ekstrak kental n-heksana dimonitor dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Uji KLT dilakukan mulai dari pelarut non polar hingga pelarut yang bersifat polar. Uji KLT ini bertujuan untuk menentukan jumlah komponen senyawa yang terkandung dalam fraksi berdasarkan jumlah dan warna noda yang ditimbulkan pada plat KLT. Dibawah lampu UV 365 nm dengan pengungkap noda NaOH 1 %.

Untuk pemisahan selanjutnya dilakukan dengan kolom kromatografi silika gel, dimulai dengan mensuspensikan silika gel sebanyak 50 gram dengan pelarut n-heksana, yang bertujuan untuk menghomogenkan dan menghilangkan kemungkinan adanya gelembung udara yang akan mengganggu pada proses pemisahan. Kolom yang sudah bersih diisi dengan eluen n-heksana kira-kira 1/3 bagian, kemudian masukkan kapas yang sebelumnya telah direndam dengan n-heksana, tepat pada lobang saluran kolom. Kran kolom dibuka sampai eluen keluar dengan lancar. untuk melewati pelarut n-heksana sambil kolom diketuk pada bagian jatuhnya silika agar silika gel yang menumpuk dalam kolom menjadi padat, dan mencegah *cracking* atau patahan yang akan mempengaruhi proses pemisahan. Agar bubuk silika menjadi padat, kolom dibiarkan terendam dengan n-heksana selama satu malam.

Sampel sebanyak 1,5 g diberi silika gel dengan perbandingan sampel dan silika gel 1 : 1, kemudian digerus dilumpang hingga kering sampai berbentuk bubuk. Bubuk sampel ini dimasukkan ke dalam kolom, selanjutnya pengelusian dapat



dilakukan. Pola elusi yang digunakan adalah peningkatan kepolaran secara bertingkat (*Step Gradient Polarity*) menggunakan eluen n-heksana dan etil asetat.

Hasil kromatografi kolom ditampung dalam botol vial masing-masing 10 mL. Selanjutnya dimonitor dengan kromatografi lapisan tipis dengan eluen n-heksana : Etil asetat berbanding 5:5. Fraksi yang memberikan noda dengan harga Rf yang sama digabungkan.

Fraksi yang mengandung kumarin diuapkan pelarutnya dan dimurnikan dengan rekristalisasi yaitu sistem pemurnian kristal kembali dengan menggunakan 2 pelarut yang dilakukan secara berulang-ulang. Pelarut yang digunakan adalah n-heksana dan etil asetat. Untuk mengetahui hasil isolasi telah murni dilakukan KLT dengan berbagai perbandingan pelarut dimana noda yang tunggal menandakan bahwa kristal telah murni. Tahapan cara kerja secara skema dapat dilihat pada lampiran 1 dan 2.

#### **3.6.4 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi**

Untuk memperoleh spektrum ultraviolet digunakan alat spektrofotometer UV. Kira-kira 1 mg kristal kumarin dilarutkan dalam metanol p.a 20 mililiter. Alat spektrofotometer diatur daerah serapannya antara 200 – 400 nm. Masukkan larutan kumarin ke dalam kuvet dan ukur serapannya dan tentukan serapan maksimumnya. Lakukan pula dengan penambahan pereaksi geser yaitu larutan natrium metoksida, aluminium klorida, asam borat dalam metanol dan sedikit kristal natrium asetat. Masukkan larutan kumarin ke dalam kuvet dan tambahkan beberapa tetes pereaksi geser. Aduk larutan kumarin sampai homogen dan tunggu kira-kira 5 menit. Ukur serapan maksimum larutan kumarin dalam metanol tanpa pereaksi geser dan larutan kumarin dalam metanol menggunakan pereaksi geser.

Untuk memperoleh spektrum inframerah, 1 miligram sampel digerus dengan 100 miligram KBr sampai homogen. Kemudian dijadikan pelet dengan memberikan tekanan tinggi. Letakkan pelet pada alat spektrofotometer inframerah dan ukur spektranya.



Untuk menentukan titik leleh, sedikit kristal kumarin dimasukkan ke dalam kapiler dan tempatkan di alat. Hidupkan alat dan atur kenaikan suhu sedikit demi sedikit. Catat suhu saat kumarin mulai meleleh dan catat pula suhu pada saat meleleh sempurna.



## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Hasil

Pada bagian kulit buah jeruk bali dilakukan uji pendahuluan profil fitokimia seperti yang dicantumkan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Hasil Uji pendahuluan profil fitokimia kulit buah jeruk bali

No.	Kandungan Kimia	Pereaksi	Keterangan
1	Flavonoid	Shianidin test (Mg/HCl)	√
2	Fenolik	FeCl <sub>3</sub>	√
3	Saponin	H <sub>2</sub> O	-
4	Triterpenoid	Liebermann-Burchard	√
5	Steroid	Liebermann-Burchard	√
6	Alkaloid	Dragendorff, Meyer	√
7	Kumarin	NaOH 1 % + Fluoresensi UV	√

Keterangan : √ = positif  
- = negatif

Dari Tabel 3 di atas, dapat diketahui bahwa kulit buah jeruk bali mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder, yaitu flavonoid, triterpenoid, steroid, alkaloid, dan kumarin. Sedangkan fenolik dan saponin tidak ditemukan pada uji pendahuluan. Kandungan kumarin dari tanaman ini dapat diketahui dari hasil KLT terhadap ekstrak heksana kulit buah jeruk sunkist hijau yang memberikan fluoresensi biru dibawah sinar UV 365 nm, lalu disemprot dengan NaOH 1%. Fluoresensi yang dihasilkan akan bertambah terang atau semakin kuat setelah disemprotkan NaOH 1 %.

Hasil ekstraksi dari 1,4 kilogram kulit buah jeruk bali dengan menggunakan pelarut metanol memberikan ekstrak kasar metanol sebanyak 361,84 gram berwarna coklat tua. Fraksinasi ekstrak kasar metanol yang dilakukan dengan n-heksana

memberikan ekstrak berwarna kuning kehijauan sebanyak 4,64 gram. Sedangkan fraksinasi dengan etil asetat memberikan ekstrak berwarna coklat kemerahan sebanyak 15,059 gram. Masing-masing fraksi, yaitu fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat, dilakukan kembali uji profil fitokimia yang ditunjukkan pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Hasil Uji pendahuluan profil fitokimia kuliat buah jeruk bali pada fraksi n-heksana dan etil asetat.

No.	Kandungan Kimia	Pereaksi	Hasil Uji	
			n-heksana	Etil Asetat
1	Flavonoid	Shinoda (Mg/HCl)	√	√
2	Fenolik	FeCl <sub>3</sub>	√	-
3	Saponin	H <sub>2</sub> O	√	-
4	Triterpenoid	Liebermann-Burchard	√	√
5	Steroid	Liebermann-Burchard	-	√
6	Alkaloid	Dragendorff, Meyer	√	√
7	Kumarin	NaOH 1 % + Fluoresensi UV	√	√

Keterangan : √ = positif  
- = negatif

Dari Tabel 4 di atas dapat diketahui bahwa kulit buah jeruk bali yang difraksinasi dengan menggunakan n-heksana mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder, yaitu flavonoid, triterpenoid, fenolik, alkaloid dan kumarin. Steroid tidak ditemukan pada fraksi n-heksana. Pada fraksi etil asetat mengandung



beberapa senyawa metabolit sekunder, yaitu flavonoid, triterpenoid, steroid, alkaloid dan kumarin. Fenolik dan saponin tidak ditemukan pada fraksi etil asetat.

Berdasarkan uji profil fitokimia pada masing-masing fraksi, maka dipilih fraksi n-heksana, karena telah menunjukkan positif kumarin dengan menggunakan pereaksi NaOH 1 % menghasilkan noda yang fluoresensi biru terang dibawah sinar UV 365 nm. Selain itu, fraksi n-heksana mengandung senyawa yang lebih sedikit komponennya bila dibandingkan dengan fraksi etil asetat. Sehingga diharapkan pemisahan senyawa dapat berlangsung lebih mudah. Dari hasil monitor terlebih dahulu dengan KLT maka metode pemisahan dengan kromatografi kolom menggunakan sistem *Step Gradient Polarity* (SGP). Adapun hasil KLT ekstrak n-heksana dengan berbagai perbandingan pelarut dapat dilihat pada Tabel 5 :

**Tabel 5.** Hasil KLT fraksi n-heksana dengan berbagai perbandingan pelarut.

No.	Eluen	Pola Noda
1.	100 % n-heksana	4 noda terangkat, 1 tailing
2.	n-heksana : EtOAc (9 : 1)	3 noda terangkat, 1 tailing
3.	n-heksana : EtOAc (8 : 2)	2 noda terangkat, 1 tailing
4.	n-heksana : EtOAc (7 : 3)	7 noda terangkat, 2 tailing
5.	n-heksana : EtOAc (6 : 4)	6 noda terangkat, 1 tailing
6.	n-heksana : EtOAc (5 : 5)	6 noda terangkat, 1 tailing
7.	n-heksana : EtOAc (4 : 6)	5 noda terangkat, 1 tailing
8.	n-heksana : EtOAc (3 : 7)	4 noda terangkat, 1 tailing
9.	n-heksana : EtOAc (2 : 8)	5 noda terangkat, 1 tailing
10.	n-heksana : EtOAc (1 : 9)	3 noda terangkat, 1 tailing
11.	100 % Etil Asetat	1 noda terangkat, 1 tailing

Adapun perbandingan pelarut digunakan untuk mengelusi adalah sebagai berikut :

**Tabel 6.** Perbandingan pelarut yang digunakan untuk mengelusi.

Eluen	Volume
n-heksana	100 mL
n-heksana : EtOAc (9 : 1)	100 mL
n-heksana : EtOAc (8 : 2)	150 mL
n-heksana : EtOAc (7 : 3)	550 mL
n-heksana : EtOAc (6 : 4)	300 mL
n-heksana : EtOAc (5 : 5)	200 mL
n-heksana : EtOAc (4 : 6)	100 mL
n-heksana : EtOAc (3 : 7)	150 mL
n-heksana : EtOAc (2 : 8)	200 mL
n-heksana : EtOAc (1 : 9)	100 mL
EtOAc	100 mL

Berdasarkan hasil KLT, fraksi-fraksi yang memiliki pola noda sama digabung menjadi fraksi yang lebih besar, sehingga didapatkan 18 fraksi. Masing-masing fraksi diuji kandungan kumarinnya.

Berdasarkan hasil KLT, fraksi-fraksi yang positif uji kandungan kumarin ada 15 fraksi. Pengerjaan difokuskan pada fraksi V karena pola nodanya sederhana dan terpisah cukup baik, serta didapatkan kristal yang relatif cukup banyak. Hasil pemurnian dengan metoda tirturasi terhadap fraksi V diperoleh kristal berwarna putih dan memberikan noda tunggal pada berbagai perbandingan pelarut. Nilai Rf yang di dapat dari kristal murni dapat dilihat pada Tabel 7 dan diperkuat dengan keterangan gambar pada lampiran 3.



**Tabel 7.** Nilai Rf dari senyawa hasil isolasi dengan berbagai perbandingan pelarut

No.	Eluen	Rf
1.	n-heksana : EtOAc (7 : 3)	0,1
2.	n-heksana : EtOAc (5 : 5)	0,3
3.	n-heksana : EtOAc (4 : 6)	0,5
4.	n-heksana : EtOAc (3 : 7)	0,6

Spektrum UV senyawa kumarin dalam pelarut metanol menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 322 dan 241 nm. Untuk mengetahui posisi substituen yang terikat pada cincin benzen maka digunakan beberapa pereaksi geser. Adapun serapan maksimum pada masing-masing pereaksi geser dapat dilihat pada Tabel 8.

**Tabel 8.** Spektrum UV dari senyawa hasil isolasi dengan pereaksi geser.

No.	Pereaksi Geser	Serapan Maksimum (nm)	
		Pita I	Pita II
1.	NaOMe	320	241
2.	AlCl <sub>3</sub>	322	241
3.	AlCl <sub>3</sub> + HCl	322	241
4.	NaOAc	321	241
5.	NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	320	241

Karakterisasi spektrum inframerah (KBr) memperlihatkan pita serapan bilangan gelombang yang dapat dilihat pada Tabel 9



**Tabel 9.** Spektrum IR dari senyawa hasil isolasi dengan KBr

No.	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Jenis Ikatan
1.	3443	Regang O-H
2.	2931	Regang -CH <sub>3</sub>
3.	2859	Regang -CH
4.	1730	Regang C=O
5.	1459	Bending C=C
6.	1375	Bending C-H
7.	1183	Regang C-O

#### 4.2 Pembahasan

Pada uji pendahuluan fitokimia terhadap kulit buah jeruk bali, diketahui bahwa sampel ini mengandung metabolit sekunder, yaitu golongan flavonoid, terpenoid, alkaloid, fenolik dan kumarin.

Ekstrak kasar metanol yang didapatkan berwarna merah kecokalatan sebanyak 361,84 gram. Fraksinasi ekstrak metanol dalam pelarut n-heksana memberikan ekstrak berwarna kuning sebanyak 4,64 gram. Sedangkan fraksinasi dengan etil asetat memberikan ekstrak berwarna coklat kemerahan sebanyak 15,059 gram.

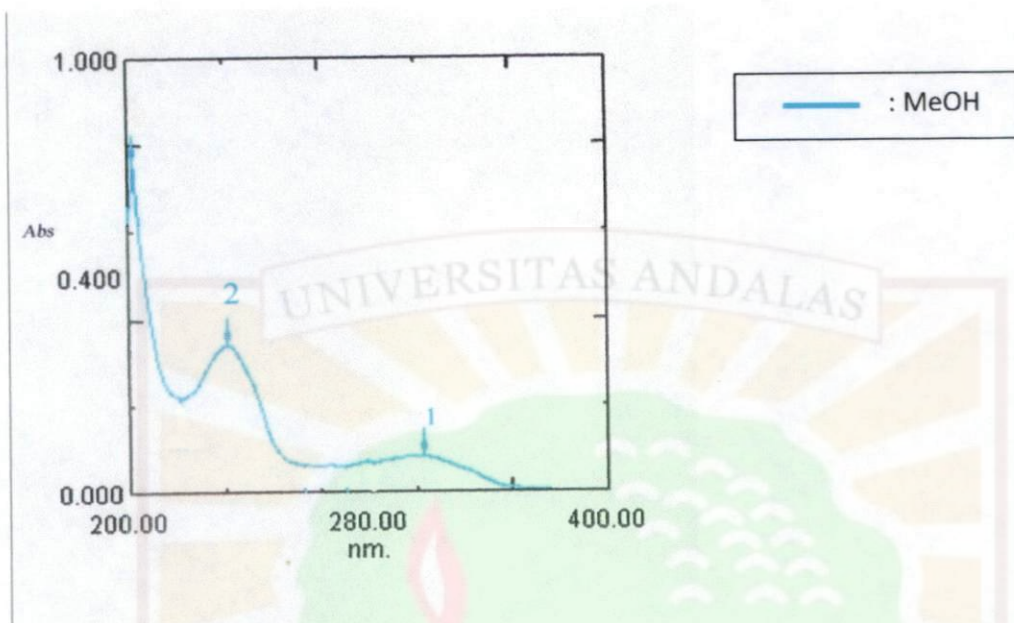
Uji KLT terhadap fraksi n-heksana, menggunakan eluen dari berbagai perbandingan pelarut non polar sampai pelarut polar untuk menentukan metoda elusi yang akan digunakan. Berdasarkan hasil uji KLT ini, ekstrak n-heksana dipilih untuk dilanjutkan karena pemisahan noda yang dihasilkan cukup baik dengan jarak yang cukup besar diantara komponen-komponennya. Pemisahan dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan sistem SGP (*Step Gradient Polarity*) menggunakan perbandingan pelarut yang bertahap mulai dari non polar hingga polar.

Hasil pengoloman ditampung ditampung dalam vial-vial dan dikelompokkan berdasarkan uji KLT, dimana noda dengan Rf yang sama digabung dalam satu fraksi, sehingga didapatkan 18 fraksi besar. Dari 18 fraksi tersebut diperoleh 15 fraksi yang memberikan uji positif kumarin. Selanjutnya pengerjaan difokuskan pada fraksi V karena pola nodanya sederhana dan terpisah cukup baik, serta didapatkan kristal yang relatif cukup banyak.

Hasil pemurnian terhadap fraksi V yang dimurnikan dengan metoda *tirturasi*<sup>17</sup> menambahkan larutan DCM (Diklorometana) kemudian ditambahkan n-heksana setetes demi setetes yang nantinya akan membentuk 2 lapisan. Lapisan atas yang merupakan fraksi n-heksana dan lapisan bawah adalah fraksi DCM. Lapisan atas dipipet dan dipindahkan ke dalam vial baru. Fraksi DCM dimonitor dengan KLT untuk melihat pemisahan noda. Uji KLT menghasilkan 2 noda yang terpisah baik. Fraksi DCM kembali ditambahkan pelarut n-heksana setetes demi setetes hingga terbentuk 2 lapisan, selanjutnya dipisahkan. Adapun tujuan melarutkan kembali dengan n-heksana ditambahkan setetes demi setetes ke dalam fraksi DCM untuk menarik komponen yang bersifat non polar. Sehingga akhirnya didapatkan kristal berwarna putih. Setelah dikeringkan dalam desikator dan di uji kandungan kumarinnya, fraksi DCM menghasilkan kristal putih berbentuk jarum dan memberikan noda tunggal pada berbagai perbandingan pelarut. Hasil KLT memperlihatkan noda tunggal yang berfluoresensi biru di bawah lampu UV  $\lambda = 365$  nm sebagai penampak noda dan menggunakan  $\text{NH}_3$  yang membuat noda tampak semakin terang. Berdasarkan literatur diketahui terbentuknya warna fluoresensi biru merupakan karakteristik dari senyawa kumarin<sup>5</sup>. Sehingga didapatkan kristal yang berwarna putih dengan berat 50 miligram dan memiliki  $128,2 - 130^\circ\text{C}$ . Berdasarkan jarak titik leleh, yang memberikan jarak leleh yang cukup pendek, mengindikasikan kristal kumarin hasil isolasi telah murni. Hal ini juga diperkuat dari hasil KLT kristal kumarin menggunakan beberapa eluen dengan perbandingan tertentu. Setelah itu, senyawa isolasi ini dikarakterisasi dengan menggunakan UV dan IR. Adapun



spektrum UV senyawa kumarin yang dihasilkan dengan menggunakan pelarut MeOH dapat dilihat pada Gambar 11.

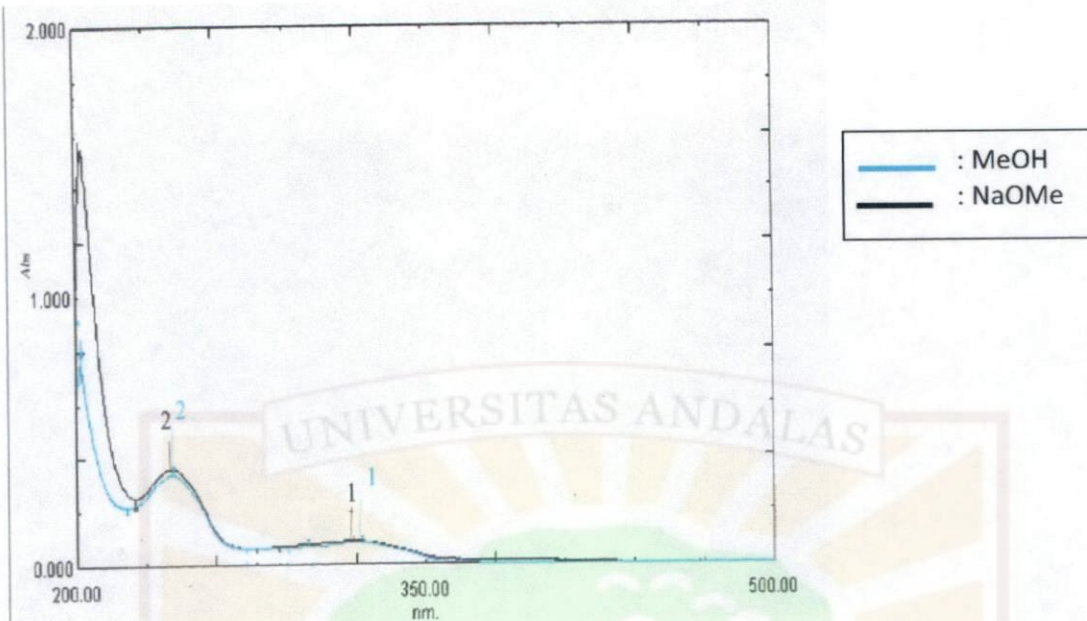


**Gambar 11.**Spektrum UV senyawa hasil isolasi dengan pelarut MeOH

Pada Gambar 11 dapat dilihat 2 pita serapan maksimum, yaitu 322 dan 241 nm. Berdasarkan pita serapan maksimum yang diperoleh, diketahui bahwa adanya ikatan rangkap konjugasi, karena sistem konjugasi menyerap cahaya pada  $\lambda_{maks}$  diatas 200 nm, ini juga menandakan adanya kromofor yang membentuk transisi dari  $\pi$  ke  $\pi^*$ , merupakan kromofor yang khas untuk sistem ikatan rangkap terkonjugasi ( $-C=C-C=C-$ ) atau pada cincin aromatik. Spektrum ini juga menandakan adanya kromofor yang memberikan transisi dari  $n$  ke  $\pi^*$ , yang memperlihatkan adanya konjugasi sistem heteroatom dengan suatu ikatan rangkap terkonjugasi ( $-C=C-C=O-$ ).<sup>11</sup>

Pada Gambar 12 dapat dilihat spektrum UV dari senyawa kumarin dengan menggunakan pereaksi geser NaOMe.

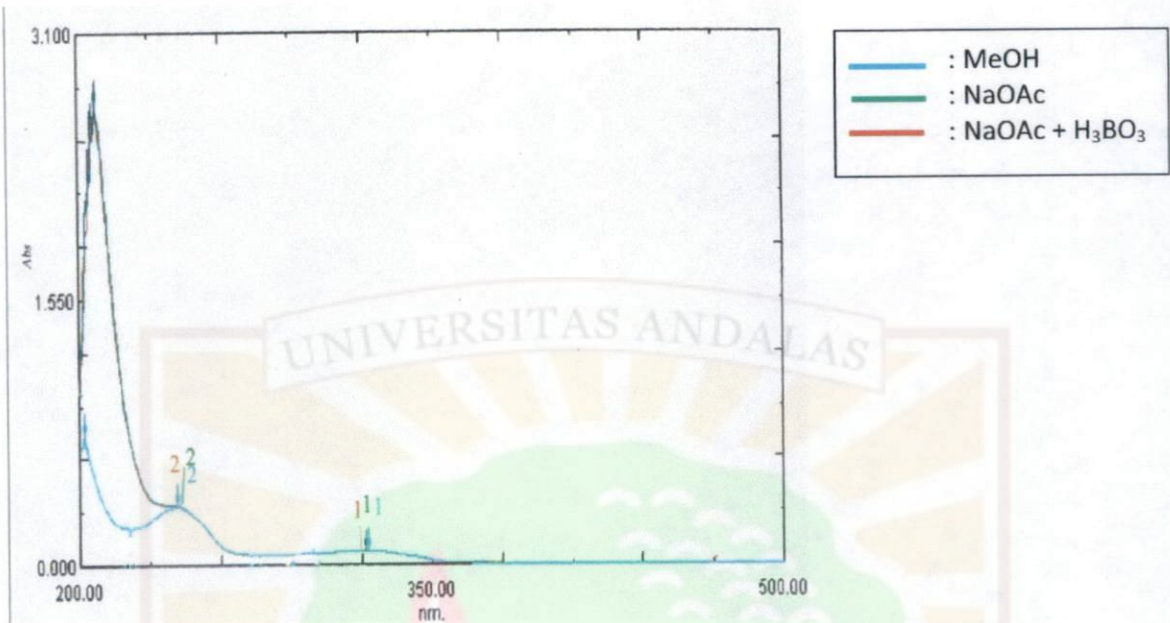




**Gambar 12.** Spektrum UV senyawa hasil isolasi dengan pereaksi geser NaOMe

Penambahan pereaksi geser NaOMe bertujuan untuk mengetahui pola hidroksilasi dan mendeteksi gugus hidroksil yang lebih asam dan tidak tersubstitusi. Puncak serapan maksimum dengan menggunakan pereaksi geser natrium metoksida pada 320 dan 241 nm. Hasil pengukuran menunjukkan tidak adanya pergeseran batokromik tetapi menunjukkan adanya pergeseran hiperkromik pada  $\lambda = 202$  nm yang menandakan adanya peningkatan intensitas serapan. Tidak adanya pergeseran batokromik menandakan tidak adanya gugus hidroksi yang terikat pada posisi atom  $C_6$ .

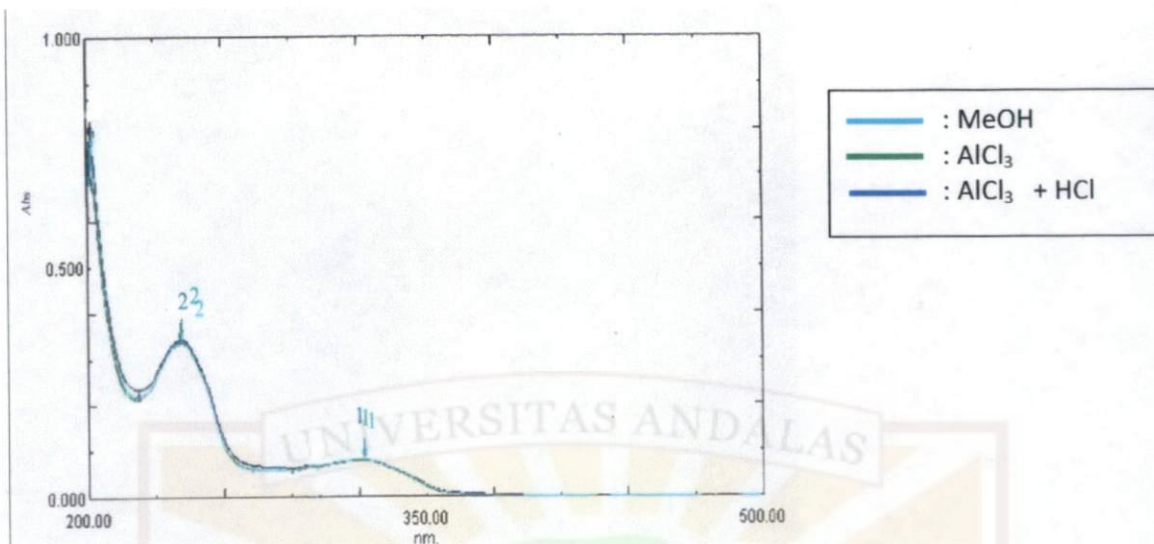
Untuk spektrum UV senyawa kumarin dengan menggunakan pereaksi geser NaOAc memberikan puncak maksimum pada 321 dan 241 nm. Hal yang sama juga ditunjukkan dengan menggunakan pereaksi geser NaOAc ditambahkan dengan  $H_3BO_3$  memberikan puncak maksimum pada 320 dan 241 nm. Hasil spektrum juga menunjukkan pergeseran hiperkromik pada  $\lambda = 207$  nm dengan intensitas absorban 2,683. Sama seperti spektrum yang ditunjukkan sebelumnya, tidak adanya pergeseran batokromik menandakan tidak adanya gugus  $-OH$  yang tersubstitusi pada posisi  $C_7$ . dilihat pada Gambar 13 berikut ini .



**Gambar 13.** Spektrum UV senyawa hasil isolasi dengan pereaksi geser NaOAc dan NaOAc +  $\text{H}_3\text{BO}_3$

Untuk spektrum UV dengan menggunakan pereaksi geser  $\text{AlCl}_3$  memberikan puncak maksimum pada 322 dan 241 nm, puncak yang sama juga ditunjukkan pada pereaksi geser  $\text{AlCl}_3$  ditambahkan  $\text{HCl}$ . Pereaksi geser ini akan membentuk kompleks tahan asam antara gugus hidroksil dan keton yang bertetangga dan membentuk kompleks tak tahan asam dengan gugus orto-dihidroksil. Tidak adanya pergeseran batokromik pada penambahan  $\text{AlCl}_3$  menandakan tidak ada gugus orto-dihidroksil pada posisi atom  $\text{C}_6$  dan  $\text{C}_7$ , puncak spektrum dapat dilihat pada Gambar 14.

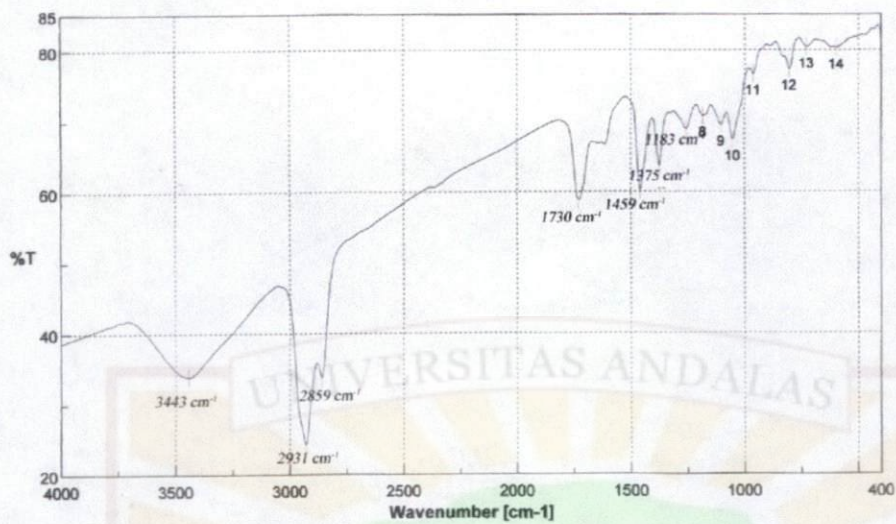




**Gambar 14.** Spektrum UV senyawa hasil isolasi dengan pereaksi geser  $\text{AlCl}_3$  dan  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$

Dari keseluruhan spektrum UV menunjukkan tidak ada pergeseran batokromik yang memberikan informasi kedudukan gugus hidroksil yang terikat pada kerangka utama kumarin. Spektrum UV yang didapatkan mempunyai serapan yang sama dengan spektrum standar kumarin (Lampiran 4).

Karakterisasi lebih lanjut dengan spektroskopi inframerah memperlihatkan beberapa pita serapan penting, antara lain pita serapan  $-\text{OH}$  pada vibrasi regangan di daerah  $3443 \text{ cm}^{-1}$ . Pita serapan regang  $\text{C-H}$  pada daerah  $2931 \text{ cm}^{-1}$  ( $3300 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ ), menurut literatur hal ini mengindikasikan adanya cincin piron pada benzen.<sup>11</sup> Pita serapan ini juga didukung dengan adanya pita serapan di daerah  $963 \text{ cm}^{-1}$  ( $1000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ ). Pita serapan  $\text{C=O}$  karbonil terdapat pada daerah  $1730 \text{ cm}^{-1}$  ( $1900 - 1650 \text{ cm}^{-1}$ ). Sedangkan serapan pada bilangan gelombang  $1459 \text{ cm}^{-1}$  merupakan vibrasi dari ikatan rangkap  $\text{C=C}$ . Vibrasi regangan  $\text{C-O}$  ester juga teramati pada daerah  $1183 \text{ cm}^{-1}$ . Hasil dari spektrum inframerah dapat dilihat pada Gambar 15.



**Gambar 15.** Spektrum IR senyawa hasil isolasi

Dari uraian data UV diperkirakan bahwa senyawa kumarin hasil isolasi dari kulit buah jeruk bali merupakan senyawa kumarin yang tidak memiliki substituen -OH. Tetapi dari uraian data IR yang menunjukkan pita serapan -OH pada vibrasi regangan didaerah  $3443\text{ cm}^{-1}$  sehingga kemungkinan gugus -OH tidak terikat pada gugus benzen melainkan terikat pada gugus alifatis.



## V.KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1.Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Kulit buah jeruk bali (*Citrus maxima* (Burm.Fz) Merr) mengandung beberapa metabolit sekunder, yaitu flavonoid, triterpenoid, steroid, alkaloid, dan kumarin.
2. Senyawa hasil isolasi berupa kristal berwarna putih dengan eluen  $R_f = 0,5$  pada eluen n-heksana : etil asetat (4 : 6),  $R_f = 0,3$  pada eluen n-heksana : etil asetat (5 : 5) dan  $R_f = 0,6$  pada eluen n-heksana : etil asetat (3 : 7).
3. Senyawa hasil isolasi diperkirakan merupakan senyawa kumarin sederhana.

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah didapatkan, maka disarankan agar :

1. Melakukan karakterisasi lebih lanjut, dengan menggunakan spektroskopi  $^1\text{H}$ -NMR dan  $^{13}\text{C}$ -NMR, serta spektroskopi massa untuk mengetahui struktur molekul senyawa kumarin yang didapat.
2. Melakukan isolasi terhadap ekstrak metanol dan etil asetat untuk mengetahui metabolit sekunder lain yang terdapat pada kulit buah jeruk bali *Citrus maxima* (Burm.Fz) Merr.

## DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Arbain, D. Hutan Sumatera : *Dari Sumber Alam Tradisional ke Sumber Daya Alam Ilmu Pengetahuan, Teknologi dan Ekonomi*, Pidato Pengukuhan Guru Besar Tetap, F-MIPA, Unand. Padang. 1997.
2. Dachriyanus., *Kimia Bahan Alam I*. Universitas Andalas, Padang, 2003.
3. <http://yamuar.wordpress.com/2007/07/13/manfaat-jeruk-bali/> 2 juni 2011/21.50 wib
4. <http://safril.wordpress.com/2011/06/22/> 2 juni 2011/22.45 wib
5. Murray, R.D.H. and Brown J. Mendez, *The Natural Coumarine*, Jhon Willey and Son Ltd, New York, 1982.
6. Wang, CK., Lee, WH., Peng, CH. *Contents of Phenolics and Alkaloids in Areca catechu Linn. during Maturation* J. Agric. Food Chem., 1997, 45 (4), pp 1185–1188.
7. Encyclopedia Britannica, Vol.6., William Benton Publisher, USA, 1968.
8. Manito, P., *Biosynthesis of Natural Products*, Ellis Horwood, Ltd, England, 1981.
9. Cresswell, C. J., *Analisis Spektrum Senyawa Organik*, edisi ke-2, ITB, Bandung, 1982.
10. Culvenor, C.C.J and J.S and J.S. Fitzgerald, *A field method for alkaloids screening of plants*, J.Pharm.Sci., 52 : 303 – 304.
11. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/pechmann-condensation.shtm> 2 juni 2011/ 23.15 wib.
12. Syamsuhidayat, Sugati S., dan Hutapea, J.R.. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia. Edisi ke-2*, Departemen Kesehatan RI Bagian Penelitian dan Pengembangan Kesehatan: Jakarta. 1991.
13. K.R.Markham. *Cara mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung : ITB. 1988.
14. Dachriyanus. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. Padang : Andalas University Press. 2004
15. Arifin, B. *Isolasi Kumarin dari Daun Gamal ( Gliricida maculata H.B.K)*. 1997.

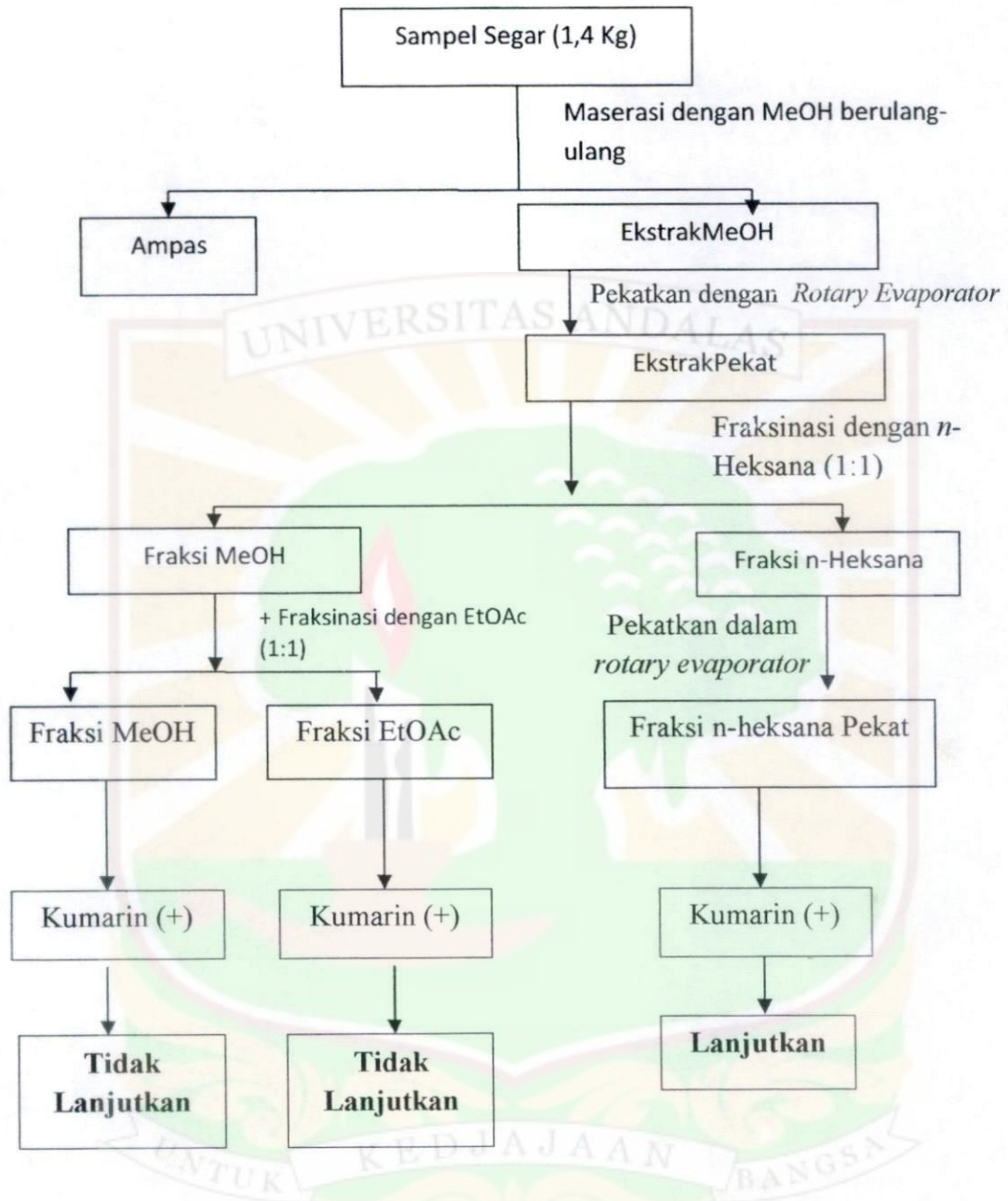


16. A. Aziz, M. A., Sukari. *Coumarin From Murraya Paniculata (Rutaceae)*. The Malaysian Journal of Analytical Sciences.2010.
17. Santoni, A. *Elusidasi Struktur Senyawa Metabolit Sekunder Batang Surian (Toona sinensis) Meliceae Dan Uji Aktivitas Insektisida*, Disertasi Pasca Sarjana UNAND, Hal 5 – 17. 2009.



Lampiran 1.

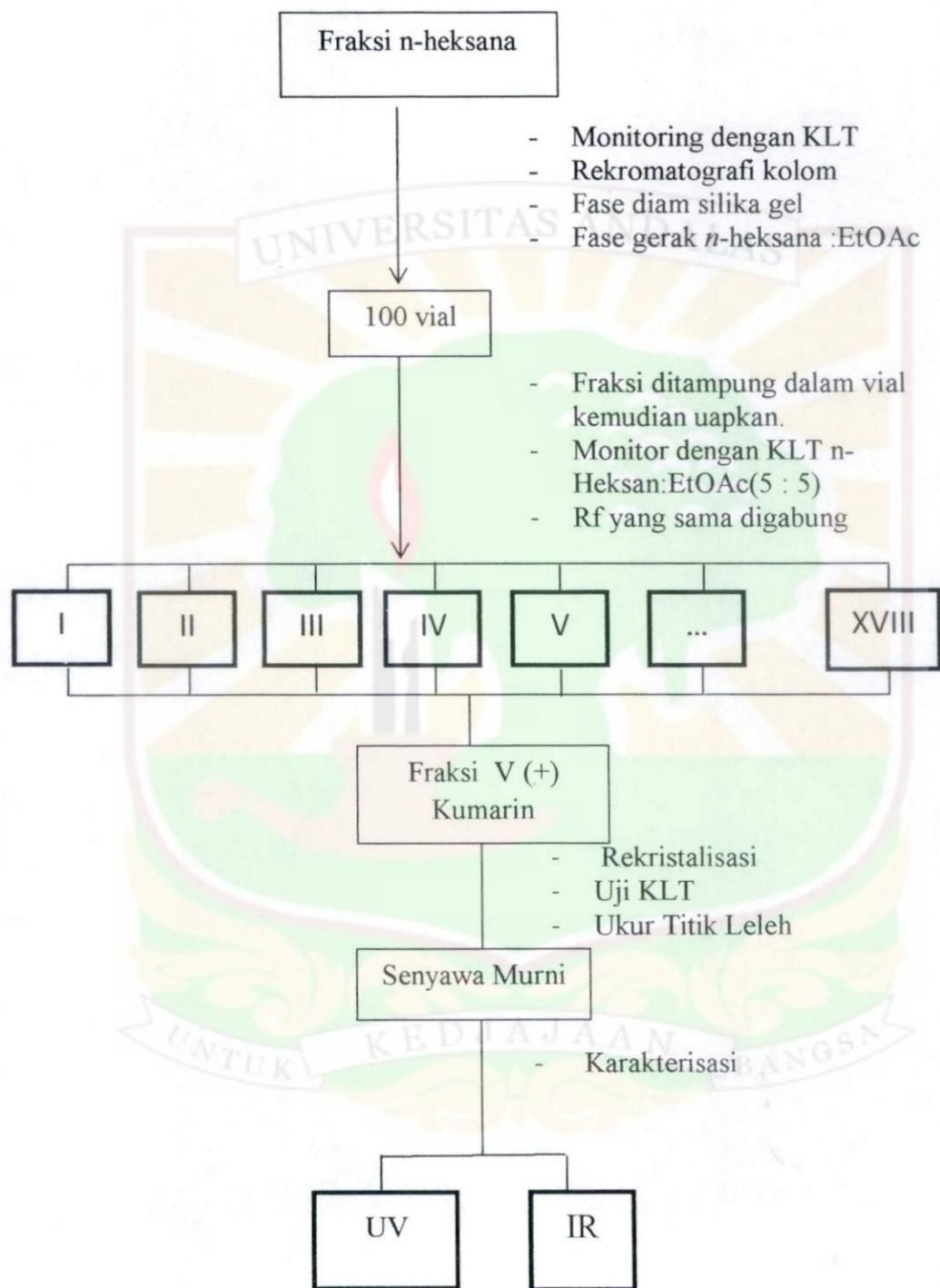
Skema Kerja isolasi kumarin dari kulit buah jeruk bali (*Citrus maxima* (Burm. Fz) Merr

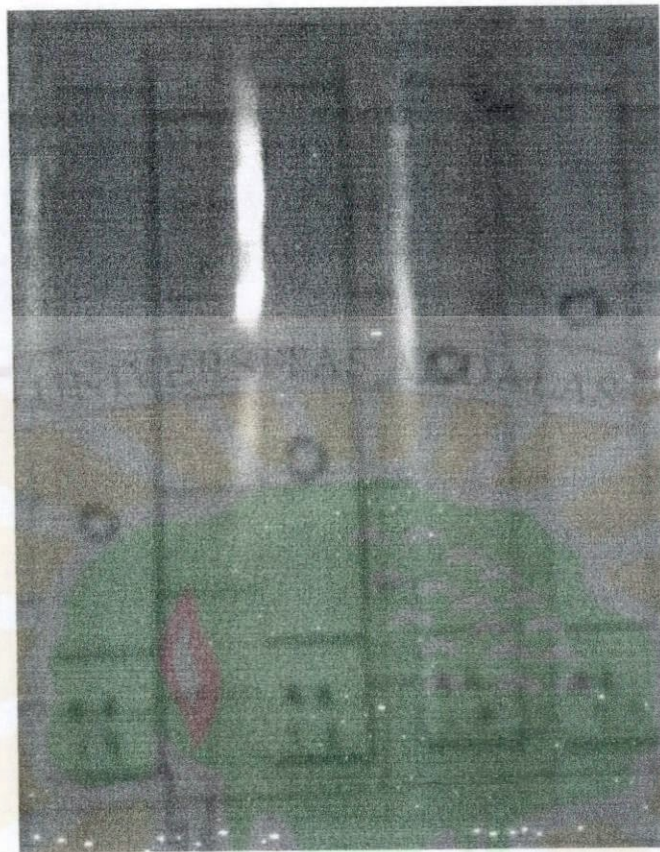




Lampiran 2

Skema kerja Pemisahan fraksi (+) Kumarin ekstrak n-heksana kulit buah jeruk bali





(a)

(b)

(c)

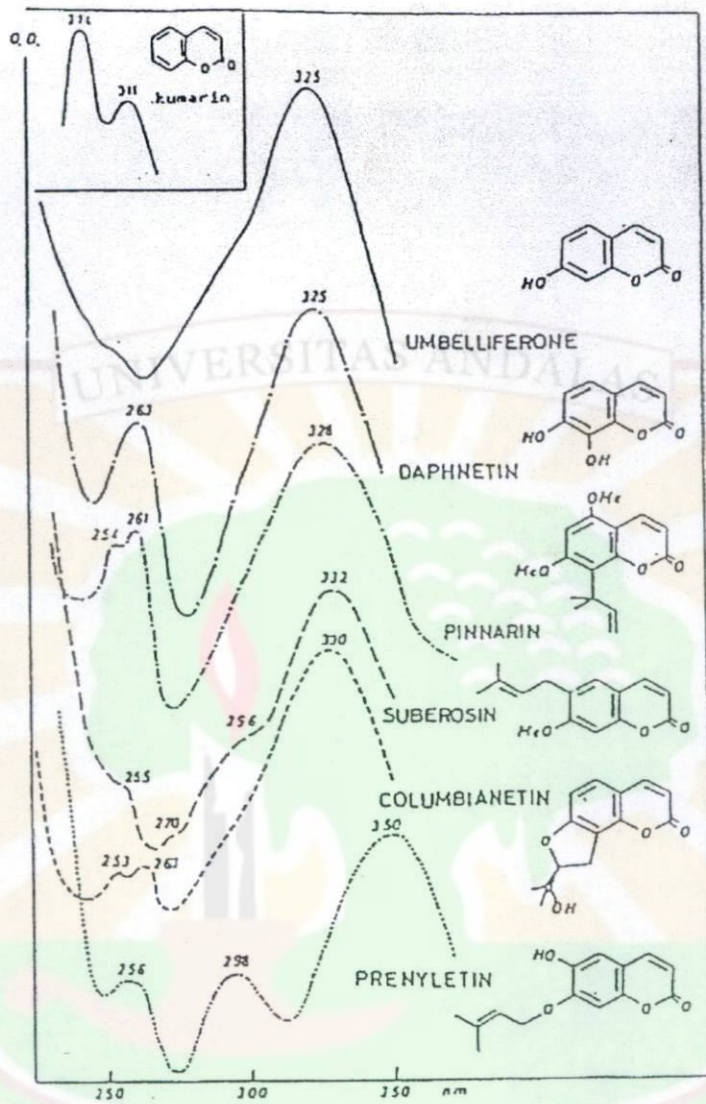
(d)

Gambar Hasil KLT senyawa isolasi dengan berbagai perbandingan eluen.

**(a)** Eluen n-heksana : EtOAc (7 : 3), dengan  $R_f = 0,1$  ; **(b)** Eluen n-heksana : EtOAc (5 : 5), dengan  $R_f = 0,3$  ; **(c)** Eluen n-heksana : EtOAc (6 : 4), dengan  $R_f = 0,5$  ; **(d)** Eluen n-heksana : EtOAc (3 : 7) dengan  $R_f = 0,6$ .



Lampiran 4



Spektrum UV golongan kumarin standar (Murray, 1985)

Lampiran 5



(a)

(b)

Gambar Tumbuhan Jeruk Bali (*Citrus maxima* (Burm.Fz) Merr).

(a). bentuk pohon beserta buah; (b) buah *Citrus maxima* (Burm. Fz) Merr dengan ciri khas seperti bola yang tertekan bagian tengah.



